

0/506631
Rec'd PCT/PTO 03 SEP 2004
PCT/JP 03/02868

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

11.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 3月11日

出 願 番 号
Application Number:

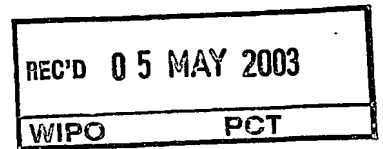
特願2002-065720

[ST.10/C]:

[JP 2002-065720]

出 願 人
Applicant(s):

エーザイ株式会社



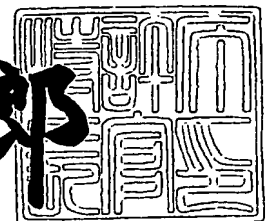
BEST AVAILABLE COPY

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月15日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3026521

【書類名】 特許願
【整理番号】 E0006RP01
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 31/525
C07D475/14

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市永国台 1-35

【氏名】 荒木 誠一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市松代 1-30-2

【氏名】 鈴木 護

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市中高津 2-12-2

【氏名】 児玉 耕太郎

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市上広岡 527-63

【氏名】 豊澤 逸生

【特許出願人】

【識別番号】 000000217

【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100079108

【弁理士】

【氏名又は名称】 稲葉 良幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100080953

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 克郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100093861

【弁理士】

【氏名又は名称】 大賀 眞司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 004983

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 リボフラビン系化合物を含む医薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とし、サイトカイン抑制作用を有する医薬。

【請求項 2】 高サイトカイン血症の予防又は治療に用いられる請求項 1 記載の医薬。

【請求項 3】 全身性炎症反応症候群の予防又は治療に用いられる請求項 1 又は 2 記載の医薬。

【請求項 4】 前記全身性炎症反応症候群は、感染に起因しないものである請求項 3 記載の医薬。

【請求項 5】 前記全身性炎症反応症候群は、外傷、熱傷、肺炎、肝障害、虚血／再灌流障害、又は手術に起因するものである請求項 4 記載の医薬。

【請求項 6】 前記サイトカイン抑制作用は、IL-1 β 、IL-6、IL-10、INF- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-8、又はMCP-1のうちの少なくとも一つを抑制するものである請求項 1～5 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 7】 リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とする、感染に起因しない全身性炎症反応症候群の予防又は治療に用いられる医薬。

【請求項 8】 前記全身性炎症反応症候群は、外傷、熱傷、肺炎、肝障害、虚血／再灌流障害、又は手術に起因する請求項 7 記載の医薬。

【請求項 9】 前記リボフラビン誘導体又はその薬理学的に許容される塩は、フラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド、リボフラビンテトラブチレイト、リン酸リボフラビンナトリウム、リン酸リボフラビンのモノジエタノールアミン塩、ロイコフラビン、モノハイドロフラビン、ロイコフラビンリン酸エステル、ロイコフラビンモノヌクレオチド、ロイコフラビンアデニンジヌクレオチド、又はこれらの薬理学的に許容される塩である請求項 1～8 のい

ずれか一項に記載の医薬。

【請求項 1 0】 前記リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理的に許容される塩の少なくとも一つを、注射剤、錠剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、カプセル剤、丸剤、又は経口液剤の形で含有する請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 1 1】 高サイトカイン血症の予防剤又は治療剤を製造するための、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理的に許容される塩の少なくとも一つの使用。

【請求項 1 2】 高サイトカイン血症の予防剤又は治療剤としての、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理的に許容される塩の少なくとも一つの使用。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理的に許容される塩（以下、リボフラビン系化合物ということがある）を有効成分とし、サイトカイン抑制作用を有する医薬に関する。また、本発明は、リボフラビン系化合物を有効成分とし、感染に起因しない全身性炎症反応症候群の予防又は治療に有用な医薬に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

多くの疾患において炎症反応が関与しており、いわゆる炎症性疾患だけではなく、アルツハイマー痴呆症や心臓疾患等においても炎症反応が重要な影響を持つことが分かってきている。

【 0 0 0 3 】

炎症反応が関与する疾患の中でも、とりわけ全身性の炎症兆候を伴う病態である全身性炎症反応症候群は、侵襲を受けた生体の反応を把握するサインとして重要である。また、この全身性炎症反応症候群となっている状態において、症状が進行したり合併症が起これば、成人呼吸促迫症候群（ARDS ; adult respirat

ory distress syndrome)、播種性血管内血液凝固(DIC; disseminated intravascular coagulation)、多臓器不全(MOF; multiple organ failure)等の機能不全(MODS; multiple organ dysfunction syndrome)に陥り、意識障害、呼吸困難、血圧低下等の症状を示し、ショック状態となり死に至る場合もある。この全身性炎症反応症候群を引き起こす原因としては、感染症のほか、外傷、熱傷、肺炎、手術等の様々な侵襲がある。

【0004】

従来から、全身性炎症反応症候群の病態には、蛋白質性シグナル伝達物質であるサイトカインの過剰誘導が関与していることが知られている。これに関して、全身性炎症反応症候群の進行度とサイトカインの血中濃度との間には一定の相関関係があることが報告されている(小川道雄:新・侵襲とサイトカイン。生体防御と生体破壊という諸刃の剣, メジカルセンス, 東京, 1999, Bone, R. C.: Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation. Crit. Care Med. 24, 163-172, 1996)。このことから、全身性炎症反応症候群は高サイトカイン血症の一つであるといえることができる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

現在まで、高サイトカイン血症の予防又は治療のために、サイトカインの誘導や発現を抑制する試みがなされている。

【0006】

例えば、副腎皮質ステロイド剤を投与してサイトカインの誘導を抑制する試みがなされている(Luce, J. M. et al.: Ineffectiveness of high-dose methyl prednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. Am. Rev. Respir. Dis. 138, 62-68, 1988)。

【0007】

また、抗TNF- α 抗体やインターロイキン-1レセプターアンタゴニスト(IL-1RA)等を投与してサイトカインの機能発現を抑制する試みがなされて

いる (Abraham, E. et al : Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor α in patients with sepsis syndrome : A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. J. A. M.A. 273 , 934-941, 1995, Fisher, C. J. et al. : Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome : Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J. A. M. A. 271 , 1836-1844, 1994, Dhainaut, J-F. A. et al. : Platelet-activating factor receptor antagonist BN 5021 in the treatment of severe sepsis : A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. Crit. Care Med. 22 , 1720-1728, 1994, Fisher, J-C. J. et al . : Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor : Fc fusion protein. E. Engl. J. Med. 334 , 1697-1702, 1996, Bone, R. C. : Sir Issac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Crit. Care Med. 24 , 1125-1178, 1996) 。

【 0 0 0 8 】

また、特開平 1 1 - 3 2 2 6 0 1 号公報には、N - [2 - (2 - フタルイミドエトキシ) アセチル] - L - アラニル - D - グルタミン酸を有効成分とするサイトカイン産生反応の制御による抗炎症性薬剤組成物が開示されている。

【 0 0 0 9 】

また、特表平 8 - 5 0 6 3 2 2 号公報には、カルボキシル化および／または硫酸化オリゴ糖を含有する活性 TNF - α の生産を阻害するための医薬組成物が開示されている。

【 0 0 1 0 】

しかしながら、上記の高サイトカイン血症の予防又は治療剤では、病態やその進行情況によっては十分な薬効を期待できない場合があり、より高い薬効を有し予後の改善効果についても優れた医薬の提供が望まれている。

【 0 0 1 1 】

なお、特開平 5 - 2 0 1 8 6 4 号公報及び特開平 1 0 - 2 9 9 4 1 号公報には、リボフラビン系化合物が免疫賦活・感染防御剤やトキシンショック予防治療剤

として有用である旨が開示されているが、これらにおいてはリボフラビン系化合物とサイトカインとの関係については開示されていない。

【0012】

したがって、本発明の目的は、高サイトカイン血症の予防又は治療のための優れた医薬を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究の結果、リボフラビン系化合物が優れたサイトカイン抑制作用を有することを見出した。すなわち、リボフラビン系化合物を有効成分とする医薬を投与することにより、サイトカインの誘導や発現を抑制することができ、炎症反応が関与する様々な疾患、特に、過度の侵襲が加わった生体の高サイトカイン血症の治療において、優れた薬効を示すことが分かった。

【0014】

これは、侵襲により生体内において炎症性サイトカインが誘導又は発現された際に、リボフラビン系化合物がこの炎症性サイトカインの誘導や発現を抑制して、生体の恒常性を保つ働きをすることによるものと考えられる。

【0015】

このように、リボフラビン系化合物がサイトカイン抑制作用を有することを初めて見出したことにより、本発明では、より薬効に優れた高サイトカイン血症の予防又は治療剤を提供することが可能となった。

【0016】

すなわち、本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とし、サイトカイン抑制作用を有する医薬を提供するものである。

【0017】

換言すれば、本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とする、サイトカイン抑制剤を提供するものである。

【0018】

「少なくとも一つを有効成分」とは、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩のいずれか単独を有効成分としてもよく、あるいはこれらのうち複数を有効成分としてもよい、との意味である。

【0019】

本発明の医薬は、高サイトカイン血症の予防又は治療に有用である。

高サイトカイン血症とは、血中のサイトカイン濃度が高くなる状態を伴う疾患であり、例えば、アルツハイマー痴呆症、Castleman病、関節リウマチ、変形性関節症、多発性硬化症、ベーチェット病、エリテマトーデス、アロテーム硬化症、心臓疾患、心房粘液腫、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸炎、痛風、接触性皮膚炎、乾癬症、肺繊維症、急性糸球体腎炎、メサングウム増殖腎炎、粥状動脈硬化症、結節性動脈硬化症、脈管炎、気管支喘息、慢性歯肉炎、歯周病、出血性ショック、外傷性ショック等のショック、脳腫瘍、悪性腫瘍、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎等のアレルギー、敗血症、敗血症性ショック、多臓器不全、全身性炎症反応症候群、インシュリン依存性糖尿病、ブドウ膜炎、慢性炎症、血液疾患、膠原病、筋萎縮性側索硬化症、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、花粉症等の自己免疫疾患、脳梗塞、心筋梗塞等の虚血・再灌流障害、光過敏症、蓄膿症、子宮蓄膿症、中耳炎、腹膜炎、心内膜炎、急性腎不全、急性肝障害、下痢が挙げられる。

【0020】

ここでいう敗血症とは、血中のサイトカイン濃度が通常値よりも高くなった状態を伴う敗血症を意味する。敗血症性ショックとは、当該敗血症が進行した結果、心、肺、肝、腎、脾、脳、脊髄等の内臓器のうち1以上の臓器の機能不全が起きた状態、または臓器の機能不全の結果、脱力感、めまい、起立困難、血圧低下、体温低下、不整脈、心室細動、呼吸困難、体温低下、痙攣、意識混濁、意識不明等の症状を示す状態を意味する。

また、本発明の医薬は、特に、全身性炎症反応症候群の予防又は治療に有用である。

【0021】

高サイトカイン血症の一つである全身性炎症反応症候群は、炎症性サイトカイ

ンが血中で優位となり炎症反応が起こるSIRS (systemic inflammatory response syndrome) と、抗炎症性サイトカインが血中で優位となり免疫抑制状態となって抗炎症反応（例えば、重症感染症）が起こるCARs (compensatory anti-inflammatory response syndrome) という二つの病態があると考えられている。本発明のリボフラビン系化合物を有効成分とする医薬を投与すると、そのサイトカイン抑制作用によって、SIRSの症状を予防又は治療する効果があることが分かった。また、SIRSとCARsとは互いに関連しているため、SIRSを予防又は治療することにより、本発明の医薬が有するサイトカイン抑制作用によって、CARsについても予防又は治療をすることができる。

【0022】

本発明の「全身性炎症反応症候群の予防又は治療」とは、上記のSIRSやCARsの症状が進行して引き起こされる成人呼吸促迫症候群（ARDS）、播種性血管内血液凝固（DIC）、多臓器不全（MOF）等の機能不全（MODS）の予防又は治療も含む意味であり、本発明の医薬はSIRSやCARsが進行した病態の予防又は治療にも極めて有用である。

【0023】

さらに、本発明者らは鋭意研究の結果、本発明のリボフラビン系化合物を有効成分とする医薬が、感染に起因しない全身性炎症反応症候群の予防又は治療においても顕著な効果を有することを見出した。

【0024】

「感染に起因しない全身性炎症反応症候群」としては、外傷、熱傷、肺炎、肝障害、虚血／再灌流障害、又は手術に起因する全身性炎症反応症候群が好適に挙げられる。

【0025】

前記サイトカイン抑制作用は、IL-1 β 、IL-6、IL-10、INF- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-8、又はMCP-1のうちの少なくとも一つを抑制するものであることが好ましい。

【0026】

本発明にいう「サイトカイン抑制作用」は、サイトカインの一種であるケモカ

インの抑制作用も含む意味である。ケモカインは、分子量約 1 万の保存された位置にシステイン残基を保有する、50 を越えるサイトカインの総称であり、白血球に対して走化活性を示す。IL-1 β (interleukin-1 β ; インターロイキン 1 β)、IL-6 (interleukin-6)、IL-10 (interleukin-10)、INF- γ (interferon- γ ; インターフェロン γ)、TNF- α (tumor necrosis factor- α ; 腫瘍壊死因子)、GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) はサイトカイン、IL-8 (interleukin-8)、MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1) はケモカイン (サイトカインの一種) である。

また、本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とする、感染に起因しない全身性炎症反応症候群の予防又は治療に用いられる医薬を提供する。

【0027】

「感染に起因しない全身性炎症反応症候群」としては、外傷、熱傷、脾炎、肝障害、虚血／再灌流障害、又は手術に起因する全身性炎症反応症候群が好適に挙げられる。

【0028】

上記において、前記リボフラビン誘導体又はその薬理学的に許容される塩は、フラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド、リボフラビンテトラブチレイト、リン酸リボフラビンナトリウム、リン酸リボフラビンのモノジエタノールアミン塩、ロイコフラビン、モノハイドロフラビン、ロイコフラビンリン酸エステル、ロイコフラビンモノヌクレオチド、ロイコフラビンアデニンジヌクレオチド、又はこれらの薬理学的に許容される塩であることが好ましい。

【0029】

本発明に係る医薬を投与する対象は、ヒトまたは動物である。本発明の医薬は特にヒトにおける予防又は治療に有用である。

【0030】

本発明において動物とは産業動物、伴侶動物および実験動物を指す。産業動物とはウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジ等の家畜、ニワトリ、アヒル、ウズラ、七

面鳥、ダチョウ等の家禽、ブリ、ハマチ、マダイ、マアジ、コイ、ニジマス、ウナギ等の魚類など産業上飼養することが必要とされている動物である。また、伴侶動物とはイヌ、ネコ、マーモセット、小鳥、ハムスター、金魚などのいわゆる愛玩動物、コンパニオン・アニマルを指し、実験動物とはラット、モルモット、ビーグル犬、ミニブタ、アカゲザル、カニクイザルなど医学、生物学、農学、薬学等の分野で研究に供用される動物を示す。

本発明に係る医薬の投与形態としては、特に限定されず病態やその進行状況、その他の条件によって異なるが、前記リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを、注射剤、錠剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、カプセル剤、丸剤、又は経口液剤（シロップ剤を含む）の形で含有することが好ましい。サイトカイン抑制作用のさらなる向上の観点からは、注射剤により投与することが好ましい。

注射剤の形で投与する場合には、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内、関節内、滑液嚢内、胞膜内、骨膜内等に投与することが好ましく、特に静脈内投与又は腹腔内投与が好ましい。静脈内投与は、点滴投与、ボラス投与（bolus）のいずれであってもよい。

【0031】

投与量（有効成分量）は、特に限定されず病態やその進行状況、その他の条件（投与する対象の種類、症状、年齢、体重、性別、合併症、投与時間、投与方法、剤型、感受性差等）によって異なるが、注射剤を静脈内に点滴投与する場合には、 $0.001 \sim 10 \text{ mg/kg/h}$ にて、数分～1週間投与することが好ましい。静脈内にボラス投与する場合には、 $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg}$ 、好ましくは $0.3 \sim 20 \text{ mg/kg}$ であり、さらに好ましくは $2 \sim 20 \text{ mg/kg}$ である。腹腔内投与する場合には $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg}$ 、好ましくは $0.3 \sim 20 \text{ mg/kg}$ であり、さらに好ましくは $2 \sim 20 \text{ mg/kg}$ である。筋肉内投与する場合には $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg}$ 、好ましくは $2 \sim 20 \text{ mg/kg}$ である。経口投与する場合には $1 \sim 1000 \text{ mg/kg}$ 、好ましくは $10 \sim 500 \text{ mg/kg}$ 、さらに好ましくは $30 \sim 200 \text{ mg/kg}$ である。

【0032】

本発明に係る医薬は、そのまま投与してもよく、また通常用いられる製剤添加

剤を加えて、公知の方法により注射剤（静脈内投与用（点滴用、ボラス投与用）、腹腔内投与用、筋肉内投与用、皮下投与用等）、経口剤（錠剤、顆粒剤、散在、細粒剤、カプセル剤、丸剤、経口液剤、シロップ剤等）、経皮吸収製剤、点眼剤、点鼻剤、坐剤、吸入剤（エアゾール剤、粉末状吸入剤、液状吸入剤等）、外用剤（軟膏剤、クリーム剤、液剤等）とすることができる。また、食品や飼料、飲水等に混合することもできる。

注射剤を製造する場合には、リボフラビン系化合物に、必要に応じて、溶解補助剤、pH調整剤、緩衝剤、懸濁化剤、抗酸化剤、保存剤、等張化剤などを添加し、常法により製造することができる。溶解補助剤等を輸液として点滴剤を構成してもよく、あるいはこれらに薬理学的に許容される改変を加えたものを輸液として点滴剤を構成してもよい。これらの注射剤は静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下等に投与することができる。あるいは、凍結乾燥して、用時溶解型の凍結乾燥製剤としてもよい。

【0033】

経口用固形製剤を製造する場合には、リボフラビン系化合物に、必要に応じて、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤、抗酸化剤、溶解補助剤、安定化剤などを添加し、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、カプセル剤（硬カプセル剤、軟カプセル剤）、丸剤等にすることができる。

【0034】

溶解補助剤としては、特に限定されないが、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理的食塩水、乳酸化リンゲル溶液、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート80、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マクロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエステル等が挙げられる。

【0035】

pH調整剤や緩衝剤としては、特に限定されないが、例えば、有機酸又は無機酸及び／又はその塩や、水酸化ナトリウム、メグルミン等が挙げられる。

【0036】

懸濁化剤としては、特に限定されないが、例えば、メチルセルロース、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、カルボキシメチル

セルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、トラガント末等が挙げられる。

【0037】

抗酸化剤としては、特に限定されないが、例えば、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、エトキシキン、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール等が挙げられる。

【0038】

保存剤としては、特に限定されないが、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾール等が挙げられる。

【0039】

等張化剤としては、特に限定されないが、例えば、塩化ナトリウム等が挙げられる。

【0040】

賦形剤としては、特に限定されないが、例えば、デンプン、コーンスターチ、デキストリン、ブドウ糖、乳糖、白糖、糖アルコール（マンニトール、エリスリトール、キシリトール等）、硬化油、結晶セルロース、無水珪酸、珪酸カルシウム、第二リン酸水素カルシウム等が挙げられる。

【0041】

結合剤としては、特に限定されないが、例えば、ポリビニルピロリドン、エチルセルロース、メチルセルロース、 α -化デンプン、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、プロピレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール等が挙げられる。

【0042】

崩壊剤としては、特に限定されないが、例えば、クロスボビドン、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、架橋型カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム等が挙げられる。

【0043】

滑沢剤としては、特に限定されないが、例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸カルシウム、フマル酸ステアリルナトリウム、ポリエチレングリコール6000等が挙げられる。

【0044】

錠剤、顆粒剤、散剤の場合には必要に応じてヒドロキシプロピルメチルセルロース等の皮膜コーティングを施しても良い。

【0045】

経口液剤を製造する場合には、リボフラビン系化合物に、必要に応じて、着色剤、矯味矯臭剤、抗酸化剤、溶解補助剤、安定化剤などを添加し、常法により製造することができる。

また、本発明は、高サイトカイン血症の予防剤又は治療剤を製造するための、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つの使用を提供するものである。換言すれば、本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つの使用による高サイトカイン血症の予防剤又は治療剤の製造方法を提供するものである。

また、本発明は、高サイトカイン血症の予防剤又は治療剤としての、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つの使用を提供するものである。

【0046】

また、本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを対象物（例えば、動物）に投与することを特徴とするサイトカイン抑制を行う必要のある疾患（例えば、炎症性疾患、高サイトカイン血症、全身性炎症反応症候群）の治療方法を提供するものである。

【0047】

【実施例】

次に実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれに限定されない。

【0048】

〔実験で用いた材料〕

5'-リボフラビンナトリウムリン酸エステル（リン酸リボフラビンナトリウム）は、日本薬局方品のリボフラビンナトリウムリン酸エステル（5'-FMN-Na）を合成し、これを生理食塩水（Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan）に溶解したものを用了。

【0049】

LPS（Lipopolysaccharide：リポポリサッカライド）は、大腸菌（*Escherichia coli*）血清型 O111:B4 由来リポポリサッカライドをシグマ社（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA）から購入し、これを生理食塩水に溶解したものを用了。

【0050】

ELISA（Enzyme linked-immuno-sorbent assay）キットとしては、IL-1 β 、IL-6、IL-10、INF- γ 、TNF- α 、GM-CSF、MCP-1、の各濃度の測定にはバイオソースインターナショナル社（Biosource International Inc., Camarillo, CA, USA）から購入したキットを用了。MIP-2 濃度の測定にはテクネ社（TECHNE Corporation, Minneapolis, MN, USA）から購入したキットを用了。なお、MIP-2 は、マウスのケモカインであり、好中球の走化因子である。人では IL-8 に相当する。

【0051】

NO₂/NO₃ アッセイキットは、同仁化学研究所（Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan）から購入したものを用了。

【0052】

雄 ICR マウスは、5 週齢のものを Japan SLC Inc.（Shizuoka, Japan）から購入し、23℃（許容範囲：20～26℃）、相対湿度 55%（許容範囲：40～70%）の条件下で、12 時間毎の明暗サイクル（午前 7 時にライトオンし、午後 7 時にライトオフする）において収容したものを用了。この際、マウスは、滅菌水道水や通常のえさ（MF, Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan）にアクセス自由な状態で収容した。この環境に 1 週間順応させた後、実験に供した。

【0053】

SEB（黄色ブドウ球菌毒素）は、スタフィロコッカス・アウレウス・エンテロトキシン（*Staphylococcus aureus enterotoxin*）B, BT-202を用いた。

【0054】

雄BALB/cマウスは、5週齢のものを日本チャールスリバーから購入し、前記雄ICRマウスと同様の条件で1週間順応させたものを、実験に供した。

【0055】

【実施例1：エンドトキシン誘発ショックマウスモデルに対する効果】

まず、LPS 12 mg/kgを雄ICRマウス（6週齢）に静脈内投与して、エンドトキシン誘発ショックマウスを作成した。

【0056】

コントロールグループにおいては、LPSの投与時（0時間）から、1時間、3時間、6時間、9時間、12時間、15時間、18時間、21時間、及び24時間経過後にそれぞれ採血を行った。5'-FMN-Na投与グループにおいては、LPSの投与時から6時間経過後に、20 mg/kgの5'-FMN-Naを静脈内に1回注入により投与して、LPSの投与時から9時間、12時間、15時間、18時間、21時間、及び24時間経過後にそれぞれ採血を行った。いずれの採血ポイントにおいても各グループ5例で構成した。実験の途中で死亡した個体はデータとして使用しなかった。採血にはEDTA（ethylene diamine tetraacetic acid）を含むプラスチック製注射器を用い、腹部の静脈から採取した。採取した各血液を遠心分離機（3000 rpm、10分、4℃）にかけ血漿を分離した後、-80℃にて保存した。

【0057】

次に、採取した各血漿中のサイトカイン濃度、ケモカイン濃度、及びNO（一酸化窒素）濃度を測定した。

【0058】

血漿中のサイトカイン濃度及びケモカイン濃度は、上記ELISAキットを用いてELISA法により測定した。プレートリーダー（Spectra max 250, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA）により450 nmにてプレートを読

み取り、得られたデータをSOFT max PRO 1.1 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA)を用いて分析した。

【0059】

上記測定においては、測定限界は、MIP-2については1.5 pg/mL以下、IL-6については3.0 pg/mL以下、IL-1 β については7.0 pg/mL以下、INF- γ については1.0 pg/mL以下、TNF- α については3.0 pg/mL以下、MCP-1については9.0 pg/mL以下、IL-10については0.9 pg/mL以下、GM-CSFについては1.0 pg/mL以下、とし、測定限界以下の値については0 pg/mLとした。

【0060】

血漿中のNO濃度は、NO₂/NO₃アッセイキットを用い、NO₂とNO₃の合計量を検出することにより測定した。各血漿は、それぞれマイクロコンセンレータ (Amicon: Beverly, MA, USA) によって濾過した後、遠心分離機 (15000 rpm, 15分, 4℃) にかけた。遠心分離機にかけた血漿サンプルに、NO₃還元酵素を添加し、NO₃をNO₂に転換させ、グリス試薬 (Gress reagent) を用いて総NO₂量を測定した。プレートリーダー (Spectra max 250) により540 nmにてプレートを読み取り、得られたデータについて上記SOFT max PRO 1.1を用いて分析した。

コントロールグループと5'-FMN-Na投与グループとの差異を対応のないt検定により分析した。統計学的分析は、SAS 6.12 (SAS Institute Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて行い、P値が0.05 (two-sided) より小さい場合に統計学的に有意であると判断した。

【0061】

上記のようにして測定したサイトカイン濃度の測定結果を図1～図6に、ケモカイン濃度の測定結果を図7及び図8に、NO濃度の測定結果を図9に示す。

【0062】

図1に示すように、血漿中のIL-1 β 濃度は、LPSの投与時から9時間経過後にピークを示し、その後徐々に減少した。一方、5'-FMN-Na投与グループ (LPS投与時から6時間経過後に5'-FMN-Naを投与) において

は、5' - FMN - Na 投与直後から IL - 1 β 濃度が減少し初め、LPS 投与から9時間～12時間経過の間において IL - 1 β 濃度がすみやかに低減した。

【0063】

図2に示すように、血漿中の INF - γ 濃度は、LPS の投与時から6時間経過後にピークを示し、その後徐々に減少した。一方、5' - FMN - Na 投与グループにおいては、9時間～18時間経過の間において INF - γ 濃度がすみやかに低減した。

【0064】

図3に示すように、血漿中の IL - 6 濃度は、LPS の投与後急増し1時間経過後にピークを示した後、徐々に減少した。コントロールグループにおいては、IL - 6 濃度は LPS 投与時から24時間経過後においても依然として高い値を示した。5' - FMN - Na 投与グループにおいては、6時間経過後に5' - FMN - Na を投与したことにより、IL - 6 濃度がすみやかに減少し、その状態が21時間経過後まで維持された。

【0065】

図4に示すように、血漿中の GM - CSF 濃度は、1時間～6時間経過の間においてピークを示し、9時間経過後までにはもとの値まで減少した。その後、LPS 投与時から21時間経過後において、2回目のピークが観察された。一方、5' - FMN - Na 投与グループにおいては、6時間経過後に5' - FMN - Na を投与したことにより、LPS 投与時から21時間経過後において GM - CSF 濃度を減少させる傾向が認められた。

【0066】

図5及び図6に示すように、血漿中の IL - 10 濃度と TNF - α 濃度は、LPS 投与時から1時間経過後と21時間経過後においてそれぞれ明確な2つのピークを示した。5' - FMN - Na を投与したことにより、2回目のピーク時において IL - 10 濃度及び TNF - α 濃度が減少した。

【0067】

図7に示すように、血漿中の MCP - 1 濃度は、LPS 投与後に急増し6時間経過時にピークを示した。その後、MCP - 1 濃度は徐々に低減した。5' - F

MN-Naを投与したことにより、MCP-1濃度は減少され、この状態が21時間経過後まで維持された。

【0068】

図8に示すように、血漿中のMIP-2濃度は、LPS投与後に急増し1時間～3時間経過の間においてピークを示した後減少した。その後、コントロールグループにおいては21時間経過後において2回目のピークが観察されたが、5'-FMN-Na投与グループにおいては9時間経過後にMIP-2濃度が減少し、この状態が21時間経過後まで維持された。

【0069】

図9に示すように、NO濃度はLPS投与後急増し9時間経過後にピークを示した。この高いNO値は24時間経過後まで続いた。NO値の増加はサイトカインの誘導に関係していると考えられる。5'-FMN-Naは9時間～18時間経過の間においてNO値の抑制効果を示さなかったが、21時間～24時間経過の間においてはNO値の抑制効果を示した。

【0070】

以上のように、5'-FMN-Naはエンドトキシンによって誘発された血中サイトカイン、ケモカイン、及びNOの濃度上昇を抑制する作用があることが分かった。

【0071】

〔実施例2：エキソトキシン誘発ショックマウスモデルに対する効果〕

まず、SEB0.75mg/kg及びD-ガラクトサミン1.8g/kgを、雄BALB/cマウス（6週齢）に腹腔内投与して、エキソトキシン（SEB）誘発ショックマウスを作成した。

【0072】

コントロールグループにおいては、SEBの投与時（0時間）から、6時間、9時間、12時間、15時間、及び18時間経過後にそれぞれ採血を行った。5'-FMN-Na投与グループにおいては、SEBの投与時から6時間経過後に、20mg/kgの5'-FMN-Naを静脈内に1回注入により投与して、SEBの投与時から9時間、12時間、15時間、及び18時間経過後にそれぞれ

採血を行った。いずれの採血ポイントにおいても各グループ5例で構成した。実験の途中で死亡した個体はデータとして使用しなかった。採血にはEDTAを含むプラスチック製注射器を用い、腹部の静脈から採取した。採取した各血液を遠心分離機(3000rpm、10分、4℃)にかけ血漿を分離した後、-80℃にて保存した。

【0073】

次に、採取した各血漿中のサイトカイン濃度及びケモカイン濃度を実施例1と同様にして測定・分析した。得られたサイトカイン濃度及びケモカイン濃度の測定結果を図10～図12に示す。

【0074】

図10に示すように、血漿中のINF- γ 濃度は、SEBの投与時から9時間経過後にピークを示し、その後減少した。一方、6時間経過後に5'-FMN-Naを投与したところ、12時間経過付近においてINF- γ 濃度の抑制効果が認められた。

【0075】

図11に示すように、血漿中のMIP-2濃度は、SEBの投与時から12時間経過後にピークを示し、その後減少した。SEB投与から6時間経過後に5'-FMN-Naを投与したところ、12時間経過付近においてMIP-2の抑制効果が認められた。

【0076】

図12に示すように、IL-6濃度はSEBの投与時から12時間経過後にピークを示した。SEB投与から6時間経過後に5'-FMN-Naを投与したところ、9時間～12時間経過付近においてIL-6濃度の抑制傾向が認められた。

【0077】

以上のように、5'-FMN-Naはエキソトキシンによって誘発された血中サイトカイン及びケモカインの濃度上昇を抑制する作用があることが分かった。

【0078】

【発明の効果】

本発明の医薬は、優れたサイトカイン抑制作用を有し、高サイトカイン血症を伴う炎症性疾患の予防又は治療剤等として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 LPS投与後における血漿中IL-1 β 濃度の経時変化を示すグラフである。

【図2】 LPS投与後における血漿中INF- γ 濃度の経時変化を示すグラフである。

【図3】 LPS投与後における血漿中IL-6濃度の経時変化を示すグラフである。

【図4】 LPS投与後における血漿中GM-CSF濃度の経時変化を示すグラフである。

【図5】 LPS投与後における血漿中IL-10濃度の経時変化を示すグラフである。

【図6】 LPS投与後における血漿中TNF- α 濃度の経時変化を示すグラフである。

【図7】 LPS投与後における血漿中MCP-1濃度の経時変化を示すグラフである。

【図8】 LPS投与後における血漿中MIP-2濃度の経時変化を示すグラフである。

【図9】 LPS投与後における血漿中NO濃度の経時変化を示すグラフである。

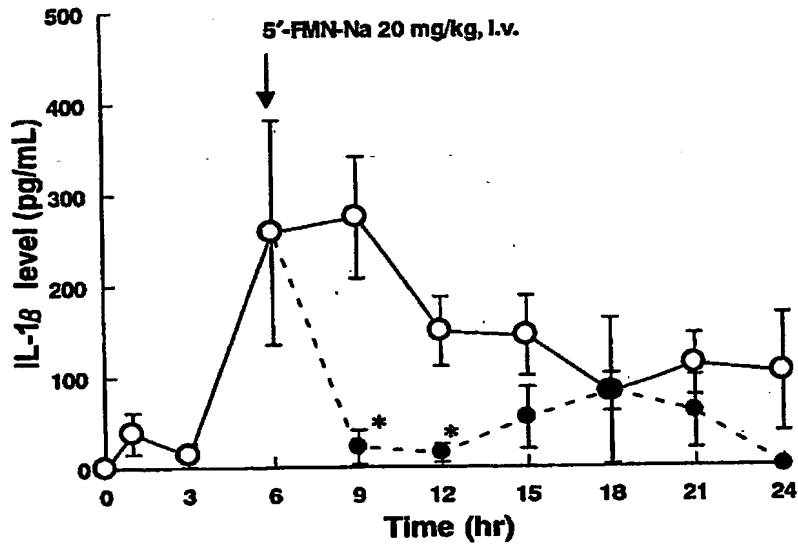
【図10】 SEB投与後における血漿中INF- γ 濃度の経時変化を示すグラフである。

【図11】 SEB投与後における血漿中MIP-2濃度の経時変化を示すグラフである。

【図12】 SEB投与後における血漿中IL-6濃度の経時変化を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



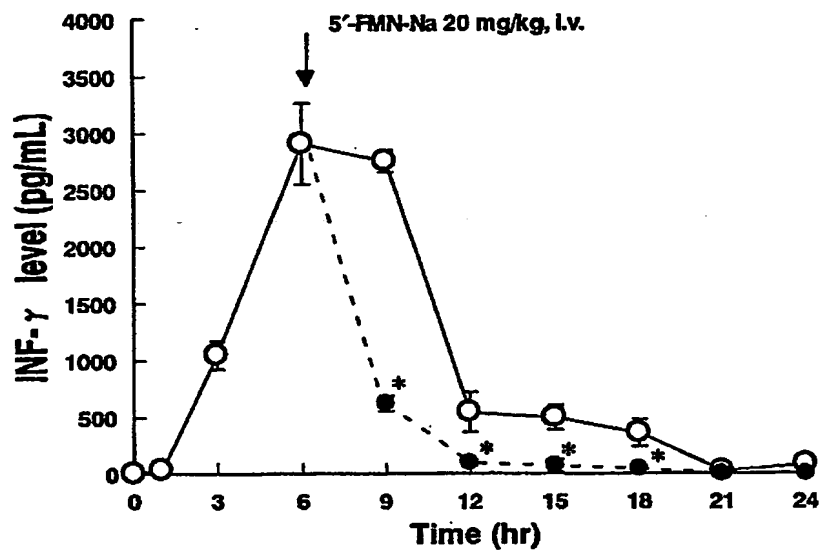
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs.コントロールグループ(対応のない t 検定)

【図 2】



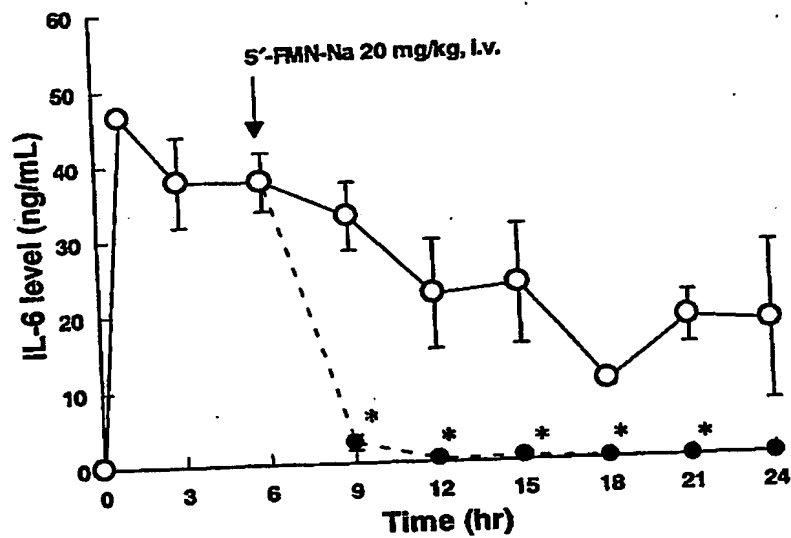
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs.コントロールグループ(対応のない t 検定)

【図3】



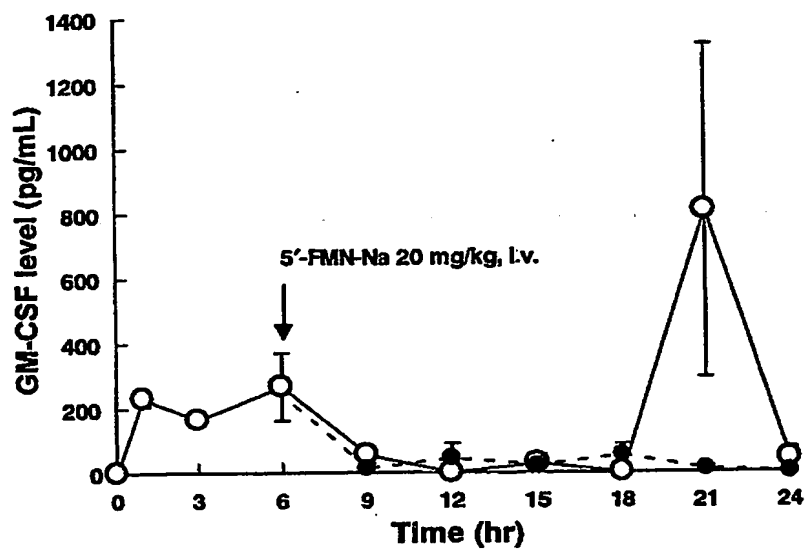
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs.コントロールグループ(対応のない t 検定)

【図 4】



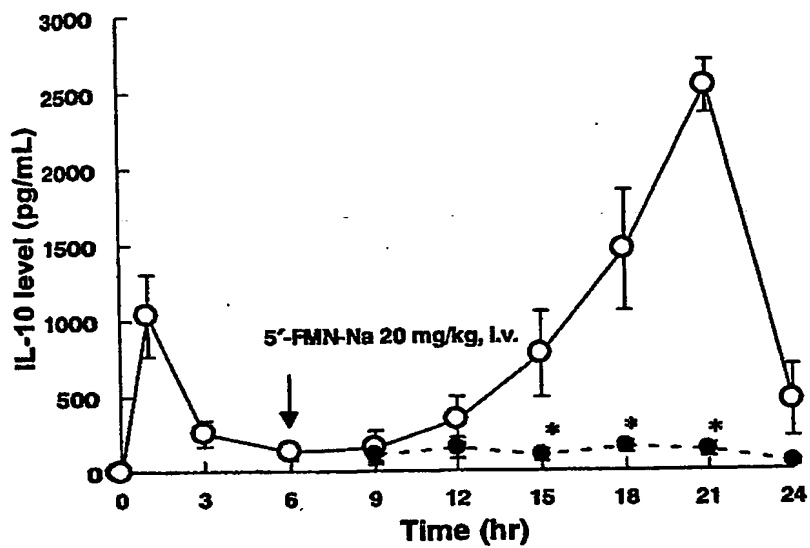
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs.コントロールグループ(対応のないt検定)

【図 5】



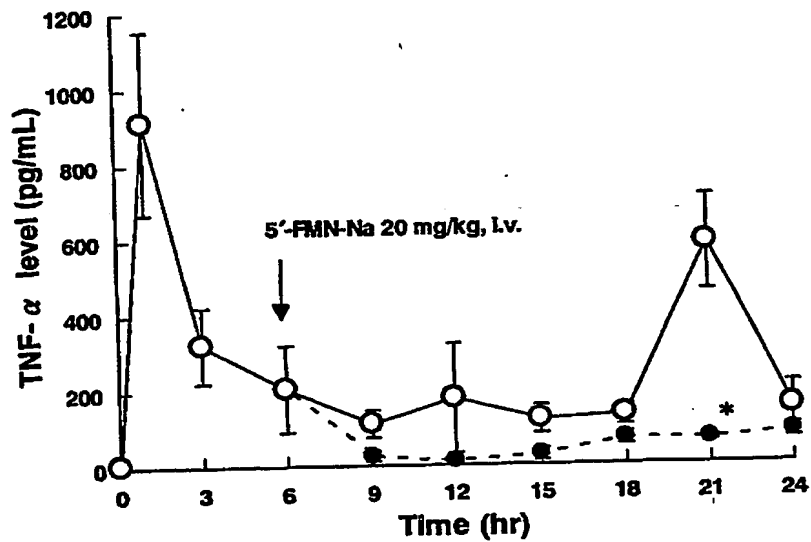
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

*P<0.05 vs.コントロールグループ(対応のないt検定)

【図 6】



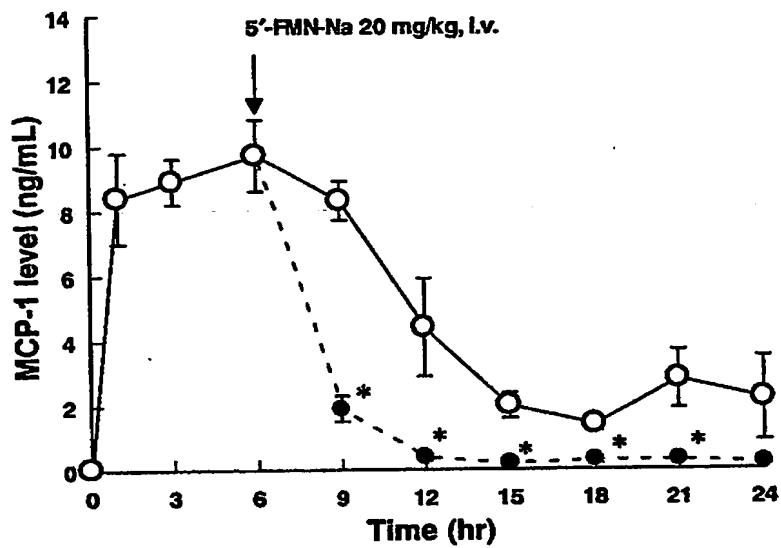
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs. コントロールグループ (対応のない t 検定)

【図 7】



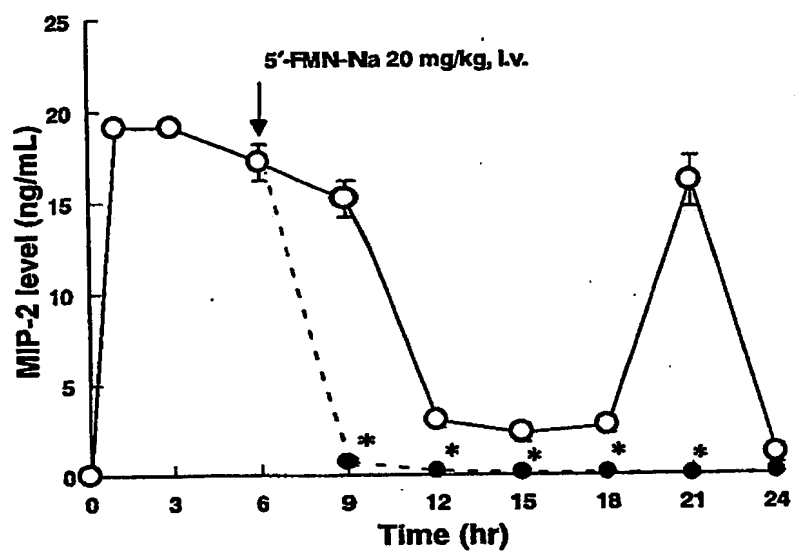
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs.コントロールグループ(対応のないt検定)

【図 8】



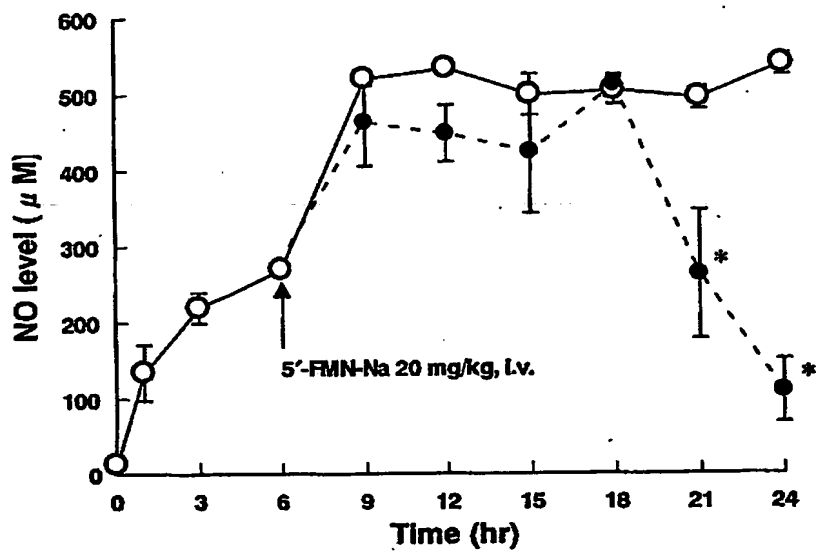
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs.コントロールグループ(対応のない t 検定)

【図9】



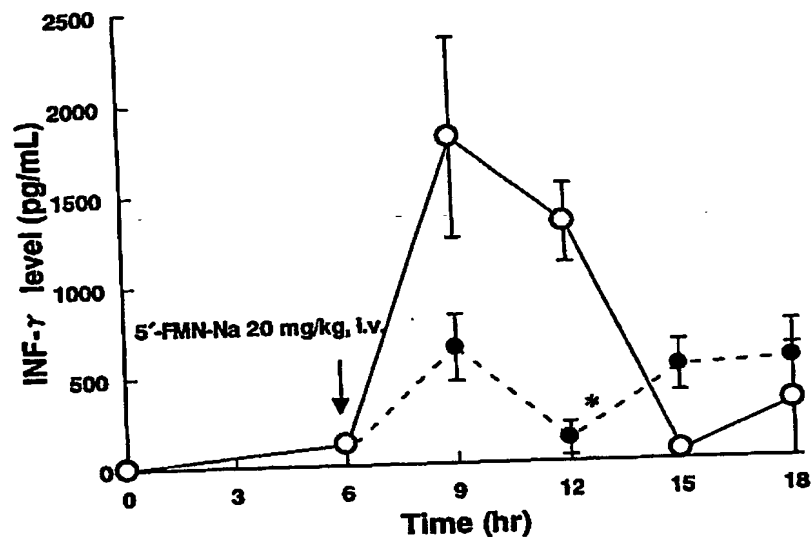
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs.コントロールグループ(対応のない t 検定)

【図10】



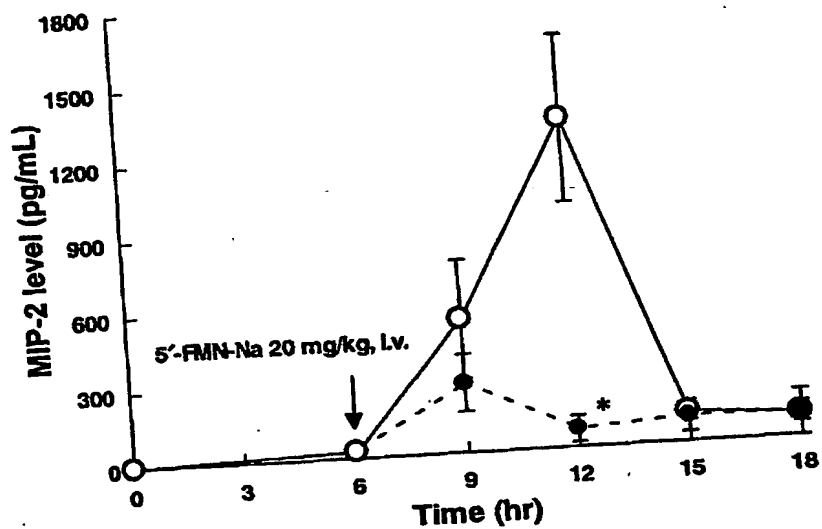
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs.コントロールグループ(対応のないt検定)

【図 11】



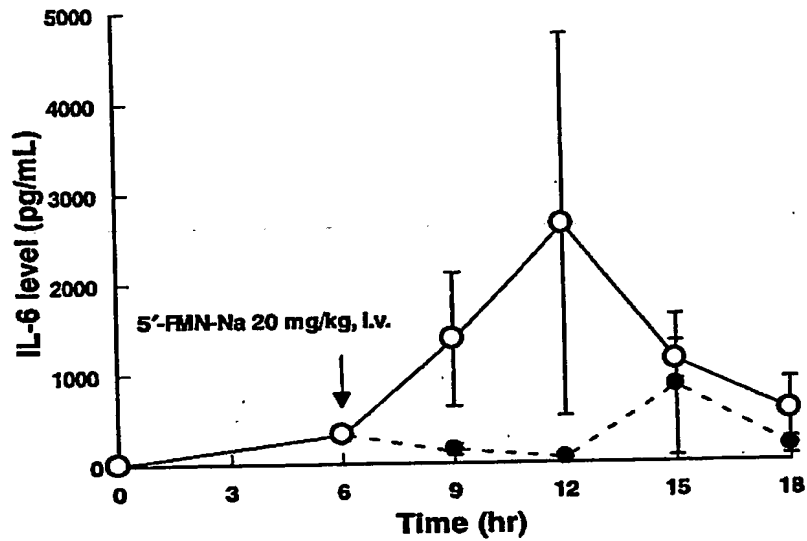
各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs.コントロールグループ(対応のない t 検定)

【図 12】



各プロットは平均値±標準誤差で表した。

○:コントロールグループ

●:5'-FMN-Na 投与グループ

* $P < 0.05$ vs.コントロールグループ (対応のない t 検定)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れたサイトカイン抑制作用を有し、全身性炎症反応症候群等の高サイトカイン血症を伴う炎症性疾患の予防又は治療剤を提供する。

【解決手段】 リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とし、IL-1 β 、IL-6、IL-10、INF- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-8、MCP-1等のサイトカインを抑制する作用を有する医薬を提供する。本発明の医薬は、感染に起因しない全身性炎症反応症候群の予防又は治療にも有用である。

【選択図】 なし

特2002-065720

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-065720
受付番号	50200337400
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成14年 3月25日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 3月11日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都文京区小石川4丁目6番10号
氏 名	エーザイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.